

STIC Translation Branch Request Form for Translation

Phone: 308-0881 Crystal Plaza ¼, Room 2C15 <http://ptoweb/patents/stic/stic-trans-home.htm>

SPE Signature Required for RUSH

Information in shaded areas marked with an * is required

Fill out a separate Request Form for each document

*U. S. Serial No. : 09/971,774

PTO 2003-2721

S.T.I.C. Translations Branch

*Requester's Name: Leigh Maier

Phone No.: 308-4525

Office Location: CMI 7A03

Art Unit/Org. : AU 1623

Is this for the Board of Patent Appeals? NO

Date of Request: 4-7-03

*Date Needed By: 7-7-03

(Please indicate a specific date)

Document Identification (Select One):

Note: If submitting a request for patent translation, it is not necessary to attach a copy of the document with the request.

If requesting a non-patent translation, please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form and submit it at your EIC or a STIC Library.

1. Patent

*Document No. _____

*Country Code _____

*Publication Date _____

*Language _____

No. of Pages _____ (filled by STIC)

2. ✓ Article

*Author Jacobi et. al.

*Language German

*Country Germany

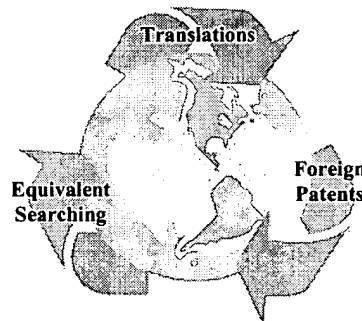
3. Other

*Type of Document _____

*Country _____

*Language _____

Translations Branch
The world of foreign prior art to you.



To assist us in providing the most cost effective service, please answer these questions:

- > Will you accept an English Language Equivalent? NO (Yes/No)
- > Would you like to review this document with a translator prior to having a complete written translation?
(Translator will call you to set up a mutually convenient time) NO Yes/No
- > Would you like a Human Assisted Machine translation? NO (Yes/No)
Human Assisted Machine translations provided by Derwent/Schreiber is the default for Japanese Patents 1993 onwards with an Average 5-day turnaround.

STIC USE ONLY

Copy/Search

Processor: _____

Date assigned: _____

Date filled: _____

Equivalent found: (Yes/No) _____

Doc. No.: _____

Country: _____

Translation

Date logged in: 4-8-03

PTO estimated words: 2634

Number of pages: 12

In-House Translation Available: _____

In-House

Translator: _____

Assigned: _____

Returned: _____

Contractor:

Name: MC

Priority: 4803

Sent: 4-18-03

Returned: 4-18-03



E-mailed 4/18/03



PERITONEAL INSTILLATION OF TAUROLIDINE AND HEPARIN FOR THE
PREVENTION OF INTRAPERITONEAL TUMOR GROWTH AND TROCAR
METASTASES IN LAPAROSCOPIC OPERATIONS USING RATS AS A MODEL

C.A. Jacobi and R. Sabat et al.

PERITONEAL INSTILLATION OF TAUROLIDINE AND HEPARIN FOR THE PREVENTION OF INTRAPERITONEAL TUMOR GROWTH AND TROCAR METASTASES IN LAPAROSCOPIC OPERATIONS USING RATS AS A MODEL

[Peritoneale Instillation von Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von intraperitoneale Tumorwachstum und Trokarmetastasen bei laparoskopischen Operationen im Rattenmodell]

ORIGINAL STUDY

Abstract Background: Although port-site metastases occur after laparoscopic surgery, there is no generally accepted approach to prevent tumor implantation so far. Methods: In order to prevent tumor metastases, the effect of taurolidine and heparin on the growth of colon adenocarcinoma DHD/K12/TRb was measured in vitro and in a rat model. After incubation of the cells with heparin, taurolidine or both substances, the cell kinetics were determined. In a second experiment, tumor cells were administered intraperitoneally in rats ($n=60$) and pneumoperitoneum was established over 30 min. Rats were randomized into four groups (I: tumor cells; II: cells+heparin; III: cells+taurolidine; IV: cells+taurolidine+heparin). Results: While tumor cell growth was not influenced by heparin in vitro, growth decreased significantly after incubation with taurolidine and taurolidine/heparin. In vivo, intraperitoneal tumor weight was lower in rats receiving heparin (298 ± 155 mg) and taurolidine (149 ± 247 mg) than in the control group (596 ± 278 mg). When the two substances were combined, tumor growth was even less (21.5 ± 36 mg). Trocar metastases were only lower in rats receiving taurolidine or the combination of taurolidine and heparin. Conclusion: In vivo, heparin inhibits intraperitoneal tumor growth only slightly, while taurolidine causes a significant decrease in tumor cell growth in vitro as well as intraperitoneal tumor growth and trocar metastases in vivo.

Key words Portside metastases · Taurolidin · Tumor growth · Heparin

In addition to the treatment of benign afflictions, endoscopic operative procedures are also being carried out increasingly in cases of complicated surgical interventions such as the resection of malignant tumors [11-13].

However, it is precisely with these operations that it is found that the laparoscopic technique engenders potential risks in addition to its advantages. The development of tumor metastases in the trocar channels appears to be a specific problem with laparoscopic operations to resection malignant tumors. Thus reports of trocar metastases [port-site metastases] following the laparoscopic resection of various malignant tumors have been accumulating over the past few years [2, 3, 5, 8-10, 18, 19].

Although the actual patho-mechanism for this propagation of tumor cells and the development of early recidivism in the incisions is not currently settled, instrumental manipulation at the tumor-bearing organ that is caused by the laparoscopic technique along with contamination of the instruments and the abdominal cavity are primarily held to be responsible for the occurrence of these phenomena [1, 9, 10]. In addition, the tunnel-shaped wound surface of the trocar incision and "squashing" of the tumor-bearing organ are regarded as the optimum prerequisite for the implantation of tumor cells [1]. However, clinical or experimental studies that confirm these suspicions are not available.

Since the patho-mechanism of trocar metastases is not currently settled, it is also not surprising that a standardized and clinically established therapy does not yet exist for preventing such metastases. Thus a therapy for the prevention or minimization of the formation of intraperitoneal and extraperitoneal metastases during laparoscopic operations should to be developed in an experimental study.

Method

Since it had been possible to establish anti-adherent action on cells or microorganisms with two substances (taurolidine, heparin) [4, 6], these 2 substances were tested in vitro - and also in vivo using rats as a model (BD-IX rat) - in terms of their action on the growth of tumor cells; this was done in order to develop a therapy. Taurolidine, a derivative of the amino acid taurine, also inhibits human monocytes in their production of $\text{II-1}\beta$ [4]. Since stimulation of tumor cell growth is conceivable theoretically, i.e. indirectly via the action of carbon dioxide on the peritoneal macrophages and by a change in their production of $\text{II-1}\beta$, taurolidine could also possibly be used therapeutically for the prevention of trocar metastases as a result of this mechanism. In order to be able to examine the direct influence of heparin and taurolidine on tumor cell growth, colon carcinoma cells (DHD/K 12/Trb) were cultivated initially in 1:1 Dulbeccos MEM medium/Hams F10 medium with an addition of 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L of glutamine, and 1000 IU/mL penicillin/streptomycin in a culture bottle (75 cm²/250 mL). The cells were then transferred to 24

well culture plates at a concentration of 10^4 cells/mL of culture medium per well in each case. 300 μ L of culture medium, 300 μ L of culture medium with heparin (10 IU), 300 μ L of 0.5% taurolidine, or 300 μ L of 0.5% taurolidine with heparin (10 IU) were suspended in each of 15 wells and the culture plates were incubated for 2 h in an incubator at 37°C. The cells were then washed 2 times, and taken up in culture medium; cell growth was determined by means of an EZ4U non-radioactive proliferation kit (Biomedica, Vienna, Austria). This test is based on the studies of Mosmann [22] and operates via the principle of the cellular reduction of a tetrazolium salt to give a red formazan solution which can be detected at 450 nm using a microtiter reader. The optical density hereby correlates directly with the number of living cells in the suspension.

Measurement of the optical density was carried out after incubation as well as after 24, 48, and 72 h. The experiments were all repeated 5 times, so that 15 wells could be analyzed in total in each group for each point in time of measurement.

The effect of the two substances on the production of $\text{IL-1}\beta$ by peritoneal macrophages in rats was also investigated since $\text{IL-1}\beta$ stimulates the subdivision of the most widely differing cells [21, 27], and increased perioperative production of this interleukin via peritoneal macrophages could indirectly influence tumor cell growth. Harvesting of peritoneal macrophages via lavage with 30 mL of the culture medium took place first of all. After determining the number of peritoneal macrophages, these were introduced, in culture medium, at a concentration of 1×10^4 cells/well, into a total of 30 wells and subdivided into 3 groups. 50 μ L of taurolidine per well were added to the 1st group; an addition of 10 IU of heparin took place in the 2nd group, and the 3rd group served as the control group. The macrophages were then incubated for 5 h in an incubator at 37°C; the concentration of $\text{IL-1}\beta$ in the supernatant was then determined by means of the Elisa technique. A commercially obtainable Elisa (Laboserv, Gießen, Germany) was used in order to determine the $\text{IL-1}\beta$ level in the supernatant. In order to produce stimulation of the macrophages, an addition of 0.5 ng of lipopolysaccharide (LPS) also took place in a further experimental series involving all the groups. After incubation in an incubator for 5 h at 37°C, the concentration of $\text{IL-1}\beta$ in the supernatant was measured by means of the Elisa technique. The experiments were all repeated 5 times, so that a total of 15 wells could be analyzed in each group per measurement.

The influence of the intraperitoneal instillation of heparin, taurolidine, and a combination of the two substances on the development of intraperitoneal metastases and trocar metastases during laparoscopy was then analyzed in an animal model (BD-IX rat). 10^4 tumor cells were applied to each of 60 rats by means of a sterile intraperitoneal injection, and then the animals were randomized into 4 groups of 15 rats:

- Group I: intraperitoneal instillation of 1 mL of culture medium as the control group;
- Group II: intraperitoneal instillation of 1 mL of culture medium and heparin (20 IU);
- Group III: intraperitoneal instillation of 1 mL of 0.5% taurolidine;

• Group IV: intraperitoneal instillation of a combination of the two substances (1 mL of 0.5% taurolidine and 20 IU of heparin).

Laparoscopy then took place with use being made of carbon dioxide (30 min, 8 mm Hg). In addition to the incision for the Verres needle, 2 further trocars (diameter 4.5 mm) were introduced in all 4 groups. In order to be able to distinguish between the incidence of tumor growth at a peritoneum that had been opened up by means of a sticking type of incision, or by means of an electrocautery, one of the two incisions was carried out with a scalpel and the other incision was carried out with an electrocautery. The animals were sacrificed four weeks after cell application and operative intervention; the number and weight of the intraperitoneal metastases were determined along with the incidence of trocar metastases.

The values are given as the mean and standard deviation. Values in accordance with the various categories were analyzed between the individual groups using Fischer's exact test, and numerical values were analyzed using the Mann-Whitney U test (individual group comparison) or using the Kruskal-Wallis test (multiple group comparison). A p value < 0.05 was defined as being statistically significant.

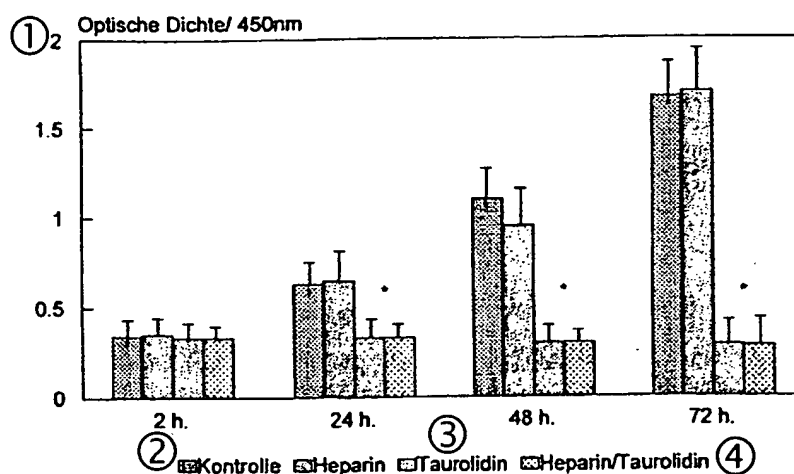


Figure 1. Illustration of the tumor cell proliferation rates in vitro after incubation with heparin ($n = 15$), taurolidine ($n = 15$), and taurolidine with heparin ($n = 15$) in comparison to the control group ($n = 15$) using the EZ4U non-radioactive cell proliferation test (mean value and standard deviation, * $p < 0.0001$)

Key: 1 Optical density/450 nm
 2 Control
 3 Taurolidine
 4 Heparin/taurolidine

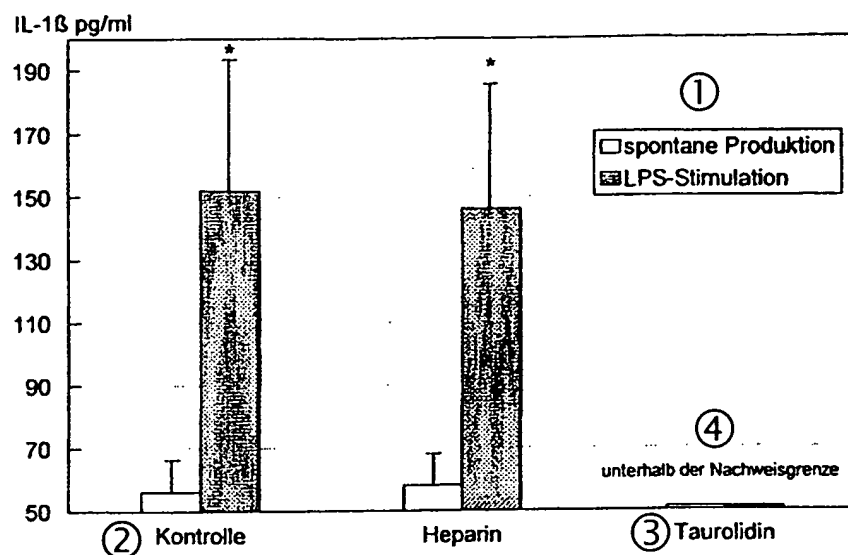


Figure 2. Effect of various substances on the production of $\text{IL-1}\beta$ via the peritoneal macrophages of rats with and without stimulation by LPS (mean value and standard deviation, * $p < 0.0001$)

Key: 1 Spontaneous production
 2 Control
 3 Taurolidine
 4 Below the detection limit

Results

In vitro growth of tumor cells

The number of living cells directly after incubation showed no significant difference between the individual groups. Pre-incubation exclusively with heparin caused no significant difference in comparison to the control group in terms of change in the growth behavior of the tumor cells. In contrast to this, significant suppression ($p < 0.001$) of tumor cell growth could be achieved with taurolidine, and also with the combination of taurolidine and heparin (Fig. 1).

$\text{IL-1}\beta$ production by peritoneal macrophages

The production of $\text{IL-1}\beta$ by the peritoneal macrophages was significantly influenced by incubation with taurolidine ($p < 0.001$). Whereas the macrophages in the control group (56 ± 7 pg/mL) and after the addition of heparin (58 ± 9 pg/mL) without LPS stimulation did not differ and a minimal production of $\text{IL-1}\beta$ was detectable, $\text{IL-1}\beta$ was no longer detected in the supernatant of the taurolidine group after 5 h of incubation. In addition, and despite LPS stimulation of the macrophages, the production of $\text{IL-1}\beta$ was completely suppressed by taurolidine. In contrast to this, a significant increase of $\text{IL-1}\beta$ was found in the control group (152 ± 40 pg/mL) and after incubation with heparin (146 ± 38 pg/mL) (Fig. 2).

Intraperitoneal tumor growth and trocar metastases

Intraperitoneal tumor growth and the development of trocar metastases were also influenced differently by the individual substances. Thus the incidence of intraperitoneal metastases declined significantly following the instillation of taurolidine (9/15) and taurolidine and heparin (7/15) ($p < 0.05$), whereas no difference was found between the control group (15/15) and the heparin group (13/15). In addition, the number of intraperitoneal metastases did not differ significantly between the 4 groups ($p < 0.0001$). Whereas the animals in the control group developed 94 ± 43 tumor nodules on average, the number per animal declined to 51 ± 31 tumor nodules following the application of heparin, and to 15 ± 19 tumor nodules following the application of taurolidine, and to only 2 ± 2 tumor nodules following the combination of the two substances. The total weight of the intraperitoneal metastases amounted to 596 ± 278 mg on average in the control group, whereas it declined to 298 ± 155 mg following the application of heparin, and to 149 ± 247 mg following the administration of taurolidine. The combination of the two substances caused a further reduction of the intraperitoneal tumor mass to 21.5 ± 36 mg on average (Fig. 3).

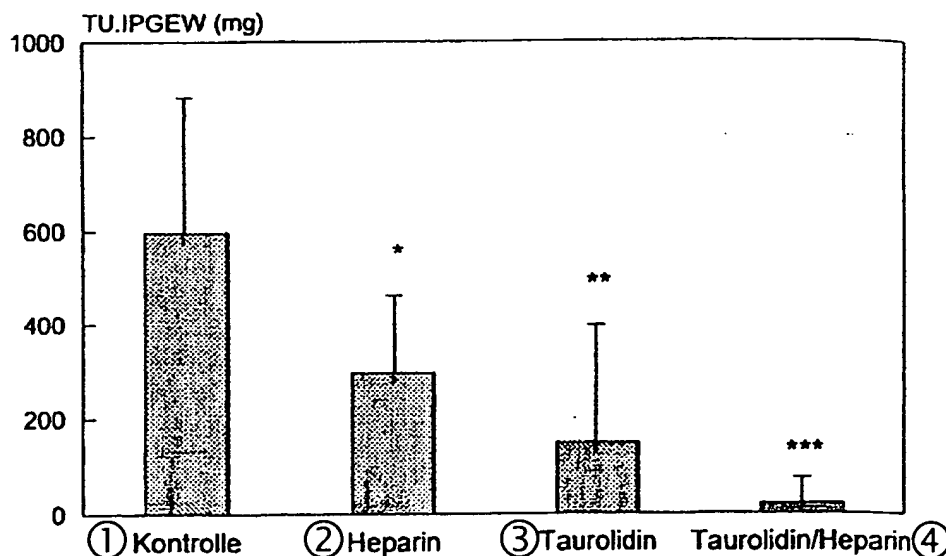


Figure 3. Weight of the intraperitoneal metastases 4 weeks after cell application and laparoscopic intervention ($n = 15$ in each group, mean and standard deviation, $p < 0.01$ heparin vs. control; ** $p < 0.001$ taurolidine vs. control; *** $p < 0.0001$ taurolidine and heparin vs. control).

Key: 1 Control
 2 Taurolidine
 3 Taurolidine/heparin
 4 TU.IPGEW (mg) [undefined abbreviation presumably meaning the weight of the intraperitoneal tumor in mg]

The incidence of trocar metastases was significantly higher following the application of heparin (12/15) and in the control group (12/15) compared to the case with taurolidine (7/15) or to the case with taurolidine and heparin (6/15) ($p < 0.05$). Independently of the instillation of the different substances, the trocar metastases developed most frequently of all at the incisions in all groups that were carried out with an electrocautery ($p < 0.01$). Although the incidence with the camera trocars was increased relative to the trocar incisions that were carried out with a scalpel, no significant difference could be detected ($p = 0.08$) (Table 1).

Table 1. Comparison of the incidence and the number of trocar metastases at the abdominal incisions between the individual groups (* $p < 0.05$ each group vs. control).

	① Inzidenz (gesamt) (n)	② Kauter (n)	③ Kamera (n)	④ Skalpelli (n)
⑤ Kontrolle	12	12	9	5
Heparin	12	12	10	3
Taurolidin	7	5*	5	3
Taurolidin/Heparin	6*	4*	3*	0*

Key: 1 Incidence (total)
 2 Cautery [device]
 3 Camera
 4 Scalpel
 5 Control
 Heparin
 Taurolidine
 Taurolidine/heparin

Discussion

Reports regarding the increased intraoperative propagation of tumor cells and the postoperative development of trocar metastases [port-site metastases] have led to lively discussions regarding the use of laparoscopic procedures in tumor surgery.

A standardized and clinically established method for preventing these stomach wall metastases does not exist at the present time, and minimum manipulation of the tumor-bearing organ and the use of waste drainage bags have not brought about the desired success so far, either. Liberal excision of the trocar incisions upon discovering an incidentaloma following laparoscopic cholecystectomy, as proposed by Wade et al. [24], can at best be regarded as a secondary action, and not as a primary causal therapy for preventing trocar metastases.

One possible cause of the implantation of tumor cells could reside in the breaching of the surface mucopolysaccharide layer of the peritoneum with consequent exposure of the extracellular matrix [7, 23]. In addition, pressure-engendered reduced perfusion of blood through the tissue arises in the trocar channels as a result of intraoperative manipulation with the trocar sheath lying in position, whereby such reduced perfusion is accompanied by the risk of necrosis formation. In contrast to an incision that is carried out by means of a scalpel, the higher incidence of trocar metastases using the camera trocar in our model could theoretically be caused by increased manipulation. Additionally expanded necroses are very probably caused by the use of an electrocautery. This hypothesis is supported by the increased incidence of trocar metastases at such a trocar incision in all the groups.

The implantation of tumor cells could be reduced in various animal experiments as a result of specific binding by the extracellular matrix [7, 15, 17, 25]. Heparin appears to act via a similar mechanism on the adherence of various bacteria, cells, and other substances. Intravesical instillation of heparin led to a reduction in the adherence of different substances to breached bladder mucous membranes in various studies [14, 16, 23]. The heparin hereby binds the free fibronectin that is released during traumatization of the mucous membrane; as a result, restoration of the anti-adherent function of the bladder's mucous membrane can be achieved [23].

Our results support this hypothetical mechanism. Although heparin did not have a suppressing effect on the proliferation of tumor cells in vitro, a significant reduction in tumor cell implantation could be achieved via intraperitoneal instillation in vivo. This action cannot be explained by the direct toxic effects of heparin since heparin does not negatively influence viability and growth in vitro. Tumor implantation at the trocar incisions was unaffected by the intraperitoneal instillation of heparin, whereby this is in contrast to intraperitoneal tumor implantation and development.

In addition to the possible mechanisms designated for heparin, the implantation and growth of tumor cells is of course affected by various other factors as well. Thus, in the case of various cells, stimulation of growth has been documented unambiguously as a result of the growth promoting $\text{II-1}\beta$ which, in humans, is produced primarily via mononuclear cells [21, 27]. The perioperatively increased production of $\text{II-1}\beta$ by peritoneal macrophages could therefore theoretically explain the stimulation of the growth of tumor cells in vivo. Kaidi et al. reported a reduction of peritoneal overgrowths following preoperative therapy with specific antibodies against $\text{II-1}\beta$ using the rat model, and they explained this action in terms of a reduction in the proliferation of the fibroblasts that are involved in the formation of overgrowths [20].

Taurolidine is a substance which inhibits not only $\text{II-1}\beta$ production by human peripheral mononuclear cells (PBMC) [4] but which also has a significant anti-adherent action on various microorganisms [20]. Although taurolidine has so far found use only in the therapy of infections of

various geneses [6, 26], taurolidine was applied intraperitoneally in our study in order to prevent the formation of extraperitoneal and intraperitoneal metastases.

An astonishing and highly significant reduction in intraperitoneal and extraperitoneal metastases was achieved as a result of the instillation of taurolidine. Direct inhibition of $\text{II-1}\beta$ production by peritoneal macrophages is hereby probable, as a result of which a growth promoting stimulus is removed from the tumor cells. It was possible to confirm this in vitro inhibition of $\text{II-1}\beta$ synthesis by peritoneal macrophages using taurolidine. In addition, however, taurolidine appears to have a direct action on tumor cells along with the resulting inhibition of cell growth. Thus cell subdivision could be completely inhibited in vitro as a result of incubation with taurolidine without thereby causing cell death. The mechanism of the action of such direct inhibition of cell subdivision is still unclear. In the case of bacteria, it has been demonstrated that taurolidine leads to inhibition of the subdivision of the bacterium via the transfer of hydroxymethyl groups to the cell wall [26]. The question as to whether a similar mechanism is responsible for the suppression of tumor cell growth in vitro or in vivo remains open, and forms a component of ongoing investigations.

Although the patho-mechanism of taurolidine and heparin remains initially hypothetical to a large extent, it has been possible to reduce significantly the incidence and growth of extraperitoneal and intraperitoneal metastases via the intraperitoneal instillation of the two substances without hereby causing visible side effects. Since the two substances have already gained entry into everyday clinical practice, we have taken the preventive therapy, which is presented here for the prevention of metastases in laparoscopic surgery of malignant tumors, to be meaningful for use in the clinical sector. On the basis of the results that have been presented, we carry out standardized postoperative lavage with 500 mL of 0.5% taurolidine/2500 IU heparin during the laparoscopic resection of all malignant tumors. Despite this, the clinical relevance of these results, which are based on animal experiments, must be checked in humans by means of prospective randomized studies.

Bibliography

1. Allendorf JD, Bessler M, Kayton ML, Oesterling SD, Treat MR, Nowygrod R, Whelan RL (1995) Increased tumor establishment and growth after laparotomy vs laparoscopy in a murine model. *Arch Surg* 130:649–653
2. Baer HU, Metzgar A, Slatli A, Klaiber C, Ruchti C, Czerniak A (1995) Subcutaneous peri-umbilical metastasis of a gallbladder carcinoma after laparoscopic cholecystectomy. *Surg Laparosc Endosc* 5:59–63
3. Barsoum GH, Windsor CWO (1992) Parietal seeding of carcinoma of the gallbladder after laparoscopic cholecystectomy (letter). *Br J Surg* 79:846
4. Bedrosian I, Sofia RD, Wolff SM, Dinarello CA (1991) Tauro-lidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 3:568–575
5. Berends FJ, Kazemier G, Bonjer HJ, Lange JF (1994) Subcutaneous metastases after laparoscopic colectomy. *Lancet* 344:58
6. Blenkham JJ (1988) Sustained anti-adherence activity of tauro-lidine (Taurolin) and noxythiolin (Noxyflex S). *J Pharm Pharmacol* 44:509–511

7. Castronovo V, Tarabolletti G, Sobel ME (1991) Laminin receptor complementary DNA-deduced synthetic peptide inhibits cancer cell attachment to endothelium. *Cancer Res* 51:5672–5678
8. Cava R, Roman J, Gonzalez Quintela A, Martin F, Aramburo P (1990) Subcutaneous metastasis following laparoscopy in gastric adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol* 16:63–67
9. Clair D, Lautz D, Brooks D (1993) Rapid development of umbilical metastasis after laparoscopic cholecystectomy for unsuspected gallbladder carcinoma. *Surgery* 113:355–358
10. Dubronte F, Wittmann T, Karacsony G (1978) Rapid development of malignant metastasis in the abdominal wall after laparoscopy. *Endoscopy* 10:127–130
11. Faust H, Reichel K (1995) Laparoscopic colon resection is an oncological resection by laparoscopy approach possible? *Zentralbl Chir* 120:392–395
12. Franklin ME, Rosenthal D, Norem RF (1995) Prospective evaluation of laparoscopic colon resection versus open colon resection for adenocarcinoma. *Surg Endosc* 9:811–816
13. Fusco MA, Paluzzi MW (1993) Abdominal wall recurrence after laparoscopic-assisted colectomy for adenocarcinoma of the colon. *Dis Colon Rectum* 36(9):858–861
14. Gill WB, Jones KW, Ruggiero KJ (1982) Protective effects of heparin and other sulfated glycosaminoglycans on crystal adhesion to injured urothelium. *J Urol* 127:151–154
15. Goldstein DS, Lu ML, Hattori T, Ratliff TL, Loughlin KR, Kavoussi LR (1993) Inhibition of peritoneal tumor-cell implantation: model for laparoscopic cancer surgery. *J Endourol* 7:237–241
16. Hayman EG, Pierschbacher D, Ruoslahti E (1985) Detachment of cells from culture substrate by soluble fibronectin peptides. *J Cell Biol* 100:1948–1954
17. Humphries MJ, Olden K, Yamada KM (1986) A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233:467–470

18. Jacobi CA, Keller H, Mönig S (1995) Implantation metastasis of unsuspected gallbladder carcinoma after laparoscopy. *Surg Endosc* 9:351–352
19. Johnstone AS, Rohde DC, Swartz SE, Fetter JE et al. (1996) Port site recurrence after laparoscopic and thoracoscopic procedures in malignancy. *J Clin Oncol* 14:1950–1956
20. Kaidi AA, Nazzal M, Gurchumelidze T (1995) Preoperative administration of antibodies against tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 and their impact on peritoneal adhesion formation. *Am Surg* 61:569–572
21. Lanfrancone L, Boraschi D, Ghiara P (1992) Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-monocyte CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 and IL-2) and are activated and stimulated to grow by IL-1. *Blood* 80:2835–2842
22. Mosmann T (1983) *J Immunol Methods* 65:55–63
23. See WA, Chapman PH (1987) Heparin prevention of tumor cell adherence and implantation on injured urothelial surfaces. *J Urol* 138:182–187
24. Wade TP, Comitalo JB, Andrus CH, Goddwin MN, Kaminski DL (1994) Laparoscopic cancer surgery. *Surg Endosc* 8:698–701
25. Whalen GF, Ingber DE (1989) Inhibition of tumor cell attachment to extracellular matrix is a method for preventing tumor recurrence in a surgical wound. *Ann Surg* 210:758–764
- [26] Wicki O., Pfirrmann R.W. (1979): Taurolin in cases of peritonitis. In: "Lokalbehandlung chirurgischer Infektionen" [Local treatment of surgical infections]. Huber, Bern.
27. Yanagisawa M, Imai H, Fukushima Y (1994) Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta on the proliferation of cultured glomerular epithelial cells. *Virchows Arch* 426:581–586

ORIGINALARBEIT

PTO 2003-2721

S.T.I.C. Translations Branch

C. A. Jacobi · R. Sabat · J. Ordemann · F. Wenger
H. D. Volk · J. M. Müller**Peritoneale Instillation von Taurolidin und Heparin
zur Verhinderung von intraperitonealem Tumorwachstum
und Trokarmetastasen bei laparoskopischen Operationen im Rattenmodell****Intraperitoneal instillation of taurolidine
and heparin for the prevention
of intraperitoneal tumor growth
and trocar metastases in laparoscopic surgery
in a rat model**

Abstract **Background:** Although port-site metastases occur after laparoscopic surgery, there is no generally accepted approach to prevent tumor implantation so far. **Methods:** In order to prevent tumor metastases, the effect of taurolidine and heparin on the growth of colon adenocarcinoma DHD/K12/TRb was measured in vitro and in a rat model. After incubation of the cells with heparin, taurolidine or both substances, the cell kinetics were determined. In a second experiment, tumor cells were administered intraperitoneally in rats ($n=60$) and pneumoperitoneum was established over 30 min. Rats were randomized into four groups (I: tumor cells; II: cells + heparin; III: cells + taurolidine; IV: cells + taurolidine + heparin). **Results:** While tumor cell growth was not influenced by heparin in vitro, growth decreased significantly after incubation with taurolidine and taurolidine/heparin. In vivo, intraperitoneal tumor weight was lower in rats receiving heparin (298 ± 155 mg) and taurolidine (149 ± 247 mg) than in the control group (596 ± 278 mg). When the two substances were combined, tumor growth was even less (21.5 ± 36 mg). Trocar metastases were only lower in rats receiving taurolidine or the combination of taurolidine and heparin. **Conclusion:** In vivo, heparin inhibits intraperitoneal tumor growth only slightly, while taurolidine causes a significant decrease in tumor cell growth in vitro as well as intraperitoneal tumor growth and trocar metastases in vivo.

Key words Portside metastases · Taurolidin · Tumor growth · HeparinC. A. Jacobi (✉) · J. Ordemann · F. Wenger · J. M. Müller
Chirurgische Klinik, Humboldt-Universität, Berlin, Charité,
Schumannstraße 20/21, D-10098 Berlin
Tel.: 030-2802-2070, Fax: 030-2802-1323R. Sabat · H.D. Volk
Institut für klinische Immunologic, Charité, Berlin

Zusammenfassung Hintergrund: Zur Zeit existiert keine einheitlich akzeptierte Therapie zur Verhinderung von Trokarmetastasen bei laparoskopischen Operationen von malignen Tumoren. Methode: Um ein intraperitoneales Tumorwachstum und Trokarmetastasen bei laparoskopischen Operationen zu verhindern, wurden die Effekte von Taurolidin und Heparin auf das Wachstum von Kolonkarzinomzellen (DHD/K12/TRb) in vitro sowie im Rattenmodell untersucht. In vitro erfolgte zunächst nach Inkubation der Zellen mit Heparin, Taurolidin oder beiden Substanzen die Bestimmung der Wachstumskinetiken der Zellen. In einem 2. Experiment erfolgte dann bei Ratten ($n=60$) die intraperitoneale Applikation der Tumorzellen und anschließend der Aufbau eines Pneumoperitoneums für 30 min. Die Ratten wurden in 4 Gruppen randomisiert (I: Tumorzellen; II: Tumorzellen und Heparin; III: Tumorzellen und Taurolidin; IV: Tumorzellen und Taurolidin + Heparin). Ergebnisse: Während das Tumorzellwachstum in vitro durch Heparin nicht beeinflusst wurde, konnte durch Taurolidin und Taurolidin/Heparin eine signifikante Supprimierung des Wachstums erreicht werden. In vivo hingegen war das intraperitoneale Tumorgewicht gegenüber der Kontrollgruppe (596 ± 278 mg) sowohl bei der Instillation von Heparin (298 ± 155 mg) als auch von Taurolidin (149 ± 247 mg) vermindert. Die Kombination beider Substanzen verursachte eine weitere Verminderung des Tumorgewichts auf durchschnittlich ($21,5 \pm 36$ mg). Die Entwicklung von Trokarmetastasen konnte hingegen nur durch die Instillation von Taurolidin oder die Kombination von Taurolidin und Heparin signifikant supprimiert werden. Schlussfolgerung: Während durch Heparin das intraperitoneale Tumorwachstum nur geringgradig beeinflusst wurde, konnten durch die Instillation von Taurolidin und Taurolidin/Heparin sowohl das intraperitoneale Tumorwachstum als auch die Entwicklung von Trokarmetastasen fast vollständig verhindert werden.

Schlüsselwörter Trokarmetastasen · Taurolidin · Tumorwachstum · Heparin

Neben der Behandlung gutartiger Erkrankungen werden endoskopische Operationsverfahren auch zunehmend bei komplizierten chirurgischen Eingriffen, wie der Resektion von malignen Tumoren, durchgeführt [11–13].

Aber gerade bei diesen Operationen hat sich gezeigt, daß die laparoskopische Technik neben ihren Vorteilen auch potentielle Gefahren in sich birgt. Bei der Resektion von malignen Tumoren scheint insbesondere die Entwicklung von Tumormetastasen in den Trokarkanälen ein spezifisches Problem laparoskopischer Operationen darzustellen. So häufen sich in den vergangenen Jahren Berichte über Trokarmetastasen nach laparoskopischer Resektion von unterschiedlichen malignen Tumoren [2, 3, 5, 8–10, 18, 19].

Obwohl der eigentliche Pathomechanismus dieser Tumorzellverschleppung und der Entstehung früher Rezidive in den Inzisionen derzeit ungeklärt ist, werden hauptsächlich eine durch die laparoskopische Technik verursachte instrumentelle Manipulation am tumortragenden Organ sowie eine Kontamination der Instrumente und der Bauchhöhle für das Auftreten dieser Phänomene verantwortlich gemacht [1, 9, 10]. Zusätzlich werden die tunnelförmige Wundfläche der Trokarinzision und das „Hindurchquetschen“ des tumortragenden Organs als optimale Voraussetzung für eine Implantation von Tumorzellen angesehen [1]. Klinische oder experimentelle Studien, die diese Vermutungen bestätigen, liegen allerdings nicht vor.

Da der Pathomechanismus der Trokarmetastasen z.Z. nicht geklärt ist, ist es nicht verwunderlich, daß eine standardisierte und klinisch etablierte Therapie zur Verhinderung solcher Metastasen bislang ebenfalls nicht existiert. In einer experimentellen Studie soll deshalb eine Therapie zur Verhinderung bzw. Minimierung der Entstehung von intra- und extraperitonealen Metastasen bei laparoskopischen Operationen entwickelt werden.

Methode

Zur Entwicklung einer Therapie wurden 2 Substanzen (Taurolidin, Heparin) in vitro und in einem Rattenmodell (BD-IX-Ratte) in vivo hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Wachstum von Tumorzellen getestet, da eine antiadhärente Wirkung auf Zellen oder Mikroorganismen bei beiden Substanzen nachgewiesen werden konnte [4, 6]. Taurolidin, ein Derivat der Aminosäure Taurin, hemmt zusätzlich menschliche Monozyten in ihrer $IL-1\beta$ -Produktion [4]. Da eine Stimulation des Tumorzellwachstums theoretisch auch indirekt durch die Einwirkung von Kohlendioxid auf die Peritonealmakrophagen und einer Veränderung ihrer $IL-1\beta$ -Produktion denkbar ist, könnte Taurolidin möglicherweise auch über diesen Mechanismus therapeutisch bei der Verhinderung von Trokarmetastasen eingesetzt werden. Um den direkten Einfluß von Heparin und Taurolidin auf das Tumorzellwachstum untersuchen zu können, wurden Kolonkarzinonzellen (DHD/K12/TRb) zunächst in Dulbeccos-MEM-Medium und Hams-F10-Medium 1:1 unter Zugabe von 10% fötalem Rinderserum, 2 mmol/l Glutamin und Penizillin-Streptomycin 1.000 IU/ml in einer Kulturflasche (75 cm²/250 ml) kultiviert. Die Zellen wurden dann in einer Konzentration von jeweils 10^4 Zellen/ml Kulturmedium pro Well in 24 Well-Kulturplatten überführt. In jeweils 15 Wells wurden zusätzlich 300 µl Kulturmedium, 300 µl Kulturmedium mit Heparin (10 I.E.), 300 µl Taurolidin 0,5% oder 300 µl

Taurolidin 0,5% mit Heparin (10 I.E.) suspendiert und die Kulturplatten für 2 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2mal gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und das Zellwachstum mittels eines nicht-radioaktiven Proliferations-Kits EZ4U (Biomedica, Wien, Österreich) bestimmt. Dieser Test basiert auf den Studien von Mosmann [22] und arbeitet mit dem Prinzip der zellularen Reduktion von Tetrazoliumsalz zu einer roten Formazanlösung, welche bei 450 nm mit dem Mikrotiterleser detektiert werden kann. Die optische Dichte korreliert hierbei direkt mit der Anzahl der lebenden Zellen in der Suspension.

Die Messung der optischen Dichte wurde jeweils nach Inkubation sowie nach 24, 48 und 72 h durchgeführt. Alle Experimente wurden 5mal wiederholt, so daß in jeder Gruppe pro Meßzeitpunkt insgesamt 15 Wells analysiert werden konnten.

Zusätzlich wurde der Einfluß beider Substanzen auf die $IL-1\beta$ -Produktion von Peritonealmakrophagen der Ratten untersucht, da $IL-1\beta$ die Teilung unterschiedlichster Zellen stimuliert [21, 27] und eine gesteigerte perioperative Produktion dieses Interleukins durch die Peritonealmakrophagen indirekt das Tumorzellwachstum beeinflussen könnte. Es erfolgte zunächst die Gewinnung von Peritonealmakrophagen durch Lavage mit 30 ml des Kulturmediums. Nach Bestimmung der Anzahl der Peritonealmakrophagen wurden diese in Kulturmedium auf 1×10^4 Zellen/Well in insgesamt 30 Wells eingesät und in 3 Gruppen eingeteilt. In der 1. Gruppe wurden 50 µl Taurolidin pro Well hinzugefügt, in der 2. Gruppe erfolgte der Zusatz von 10 I.U. Heparin und die 3. Gruppe diente als Kontrollgruppe. Die Makrophagen wurden nun für 5 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend die Konzentration von $IL-1\beta$ im Überstand mittels Elisa-Technik bestimmt. Zur Bestimmung der $IL-1\beta$ -Spiegel im Überstand wurde ein kommerziell zu erwerbender Elisa (Laboserv, Gießen, Deutschland) verwendet. Zusätzlich erfolgte in einer weiteren Versuchsreihe bei allen Gruppen die Zugabe von 0,5 ng Lipopolysaccharid (LPS), um eine Stimulation der Makrophagen zu erzeugen. Nach einer Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 5 h wurde die Konzentration von $IL-1\beta$ im Überstand mittels Elisa-Technik gemessen. Alle Experimente wurden 5mal wiederholt, so daß in jeder Gruppe pro Messung insgesamt 15 Wells analysiert werden können.

Anschließend wurde in einem Tiermodell (BD-IX-Ratte) der Einfluß einer intraperitonealen Instillation von Heparin, Taurolidin sowie der Kombination beider Substanzen auf die Entwicklung von intraperitonealen Metastasen und Trokarmetastasen bei einer Laparoskopie analysiert. Bei 60 Ratten wurden jeweils 10^4 Tumorzellen durch eine sterile Injektion intraperitoneal appliziert und anschließend die Tiere in 4 Gruppen à 15 Ratten randomisiert:

- Gruppe I: intraperitoneale Instillation von 1 ml Kulturmedium als Kontrollgruppe
- Gruppe II: intraperitoneale Instillation von 1 ml Kulturmedium und Heparin (20 I.E.)
- Gruppe III: intraperitoneale Instillation von 1 ml Taurolidin 0,5%
- Gruppe IV: intraperitoneale Instillation der Kombination beider Substanzen (1 ml Taurolidin 0,5% und 20 I.E. Heparin)

Hiernach erfolgte eine Laparoskopie unter Verwendung von Kohlendioxid (30 min, 8 mmHg). In allen 4 Gruppen wurden neben der Inzision für die Verres-Nadel 2 weitere Trokare (Durchmesser 4,5 mm) eingebracht. Um zwischen der Inzidenz von Tumorzellwachstum an durch eine Stichinzision oder durch einen Elektroauter eröffnetem Peritoneum unterscheiden zu können, wurde eine der beiden Inzisionen mit dem Skalpell und die andere Inzision mit dem Elektroauter durchgeführt. Vier Wochen nach der Zellapplikation und operativer Intervention wurden die Tiere getötet, Anzahl und Gewicht der intraperitonealen Metastasen bestimmt sowie die Inzidenz der Trokarmetastasen.

Die Werte wurden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Kategoriale Werte wurden zwischen den einzelnen Gruppen mit dem Fisher-exakt-Test und numerische Werte mit dem Mann-Whitney-U-Test (Einzelgruppenvergleich) oder mit dem Kruskal-Wallis-Test (Mehrgruppenvergleich) analysiert. Ein p -Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

Abb. 1 Darstellung der Tumorzellproliferationsraten in vitro nach Inkubation mit Heparin ($n=15$), Taurolidin ($n=15$) und Taurolidin mit Heparin ($n=15$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n=15$) mit dem nicht-radioaktiven Zellproliferations-test EZ4U (Mittelwert und Standardabweichung, * $p<0,0001$)

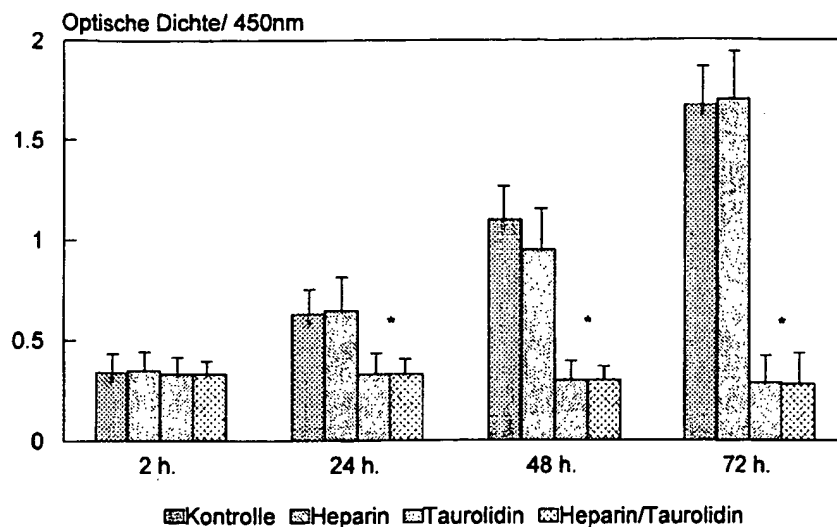
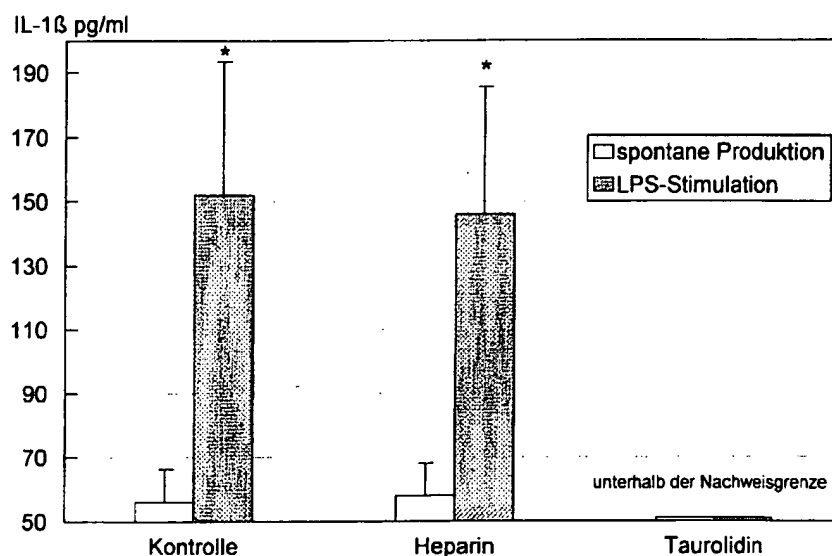


Abb. 2 Einfluß der verschiedenen Substanzen auf die IL-1 β -Produktion von Peritonealmakrophagen der Raten mit und ohne Stimulation durch LPS (Mittelwert und Standardabweichung, * $p<0,001$)



Ergebnisse

In-vitro-Wachstum der Tumorzellen

Die Anzahl der lebenden Zellen zeigte direkt nach Inkubation keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Die alleinige Vorinkubation mit Heparin verursachte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Änderung des Wachstumsverhaltens der Tumorzellen. Im Gegensatz hierzu konnte sowohl mit Taurolidin als auch der Kombination von Taurolidin und Heparin eine signifikante Supprimierung ($p<0,001$) des Tumorzellwachstums erreicht werden (Abb. 1).

IL-1 β -Produktion von Peritonealmakrophagen

Die IL-1 β -Produktion der Peritonealmakrophagen wurde nur durch die Inkubation mit Taurolidin signifikant beein-

flußt ($p<0,01$). Während die Makrophagen in der Kontrollgruppe (56 ± 7 pg/ml) und nach Zusatz von Heparin (58 ± 9 pg/ml) ohne LPS-Stimulation sich nicht unterschieden und eine minimale Produktion von IL-1 β nachweisbar war, wurde IL-1 β im Überstand der Taurolidindgruppe nach 5stündiger Inkubation nicht mehr detektiert. Weiterhin wurde die Produktion von IL-1 β trotz LPS-Stimulation der Makrophagen durch Taurolidin vollständig supprimiert. Im Gegensatz hierzu zeigte sich ein signifikanter Anstieg von IL-1 β in der Kontrollgruppe (152 ± 40 pg/ml) und nach Inkubation mit Heparin (146 ± 38 pg/ml) (Abb. 2).

Intraperitoneales Tumorwachstum und Trokarmetastasen

Das intraperitoneale Tumorwachstum und die Entwicklung von Trokarmetastasen wurden ebenfalls unterschiedlich durch die einzelnen Substanzen beeinflusst. So sank

Abb. 3 Gewicht der intraperitonealen Metastasen 4 Wochen nach Zellapplikation und laparoskopischer Intervention ($n=15$ in jeder Gruppe, Mittelwert und Standardabweichung, * $P<0,01$ Heparin vs. Kontrolle; ** $p<0,001$ Taurolidin vs. Kontrolle, *** $p<0,0001$ Taurolidin und Heparin vs. Kontrolle)

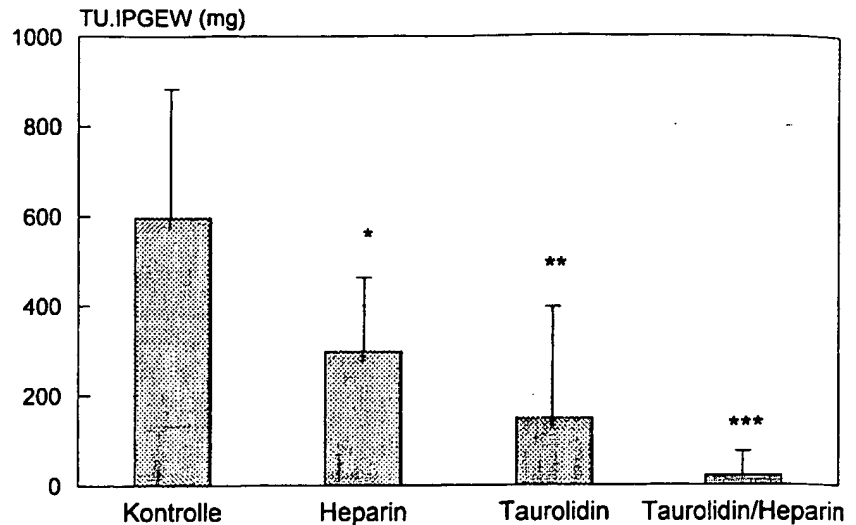


Tabelle 1 Vergleich der Inzidenz und der Anzahl der Trokarmetastasen an den abdominalen Inzisionen zwischen den einzelnen Gruppen (* $p<0,05$ jeweilige Gruppe vs. Kontrolle)

	Inzidenz (gesamt) (n)	Kauter (n)	Kamera (n)	Skalpell (n)
Kontrolle	12	12	9	5
Heparin	12	12	10	3
Taurolidin	7	5*	5	3
Taurolidin/Heparin	6*	4*	3*	0*

die Inzidenz von intraperitonealen Metastasen signifikant nach der Instillation von Taurolidin (9/15) und Taurolidin und Heparin (7/15) ($p<0,05$), während zwischen der Kontroll- (15/15) und der Heparin-Gruppe (13/15) kein Unterschied nachgewiesen wurde. Weiterhin unterschied sich die Anzahl der intraperitonealen Metastasen signifikant zwischen den 4 Gruppen ($p<0,0001$). Während die Tiere in der Kontrollgruppe durchschnittlich 93 ± 43 Tumorknoten entwickelten, sank die Anzahl nach Applikation von Heparin auf 51 ± 31 Tumorknoten, nach Taurolidin auf 15 ± 19 Tumorknoten und nach Kombination beider Substanzen auf nur noch 2 ± 2 Tumorknoten pro Tier. Das Gesamtgewicht der intraperitonealen Metastasen betrug in der Kontrollgruppe durchschnittlich 596 ± 278 mg, während es nach Applikation von Heparin auf 298 ± 155 mg und nach Gabe von Taurolidin auf 149 ± 247 mg absank. Die Kombination beider Substanzen verursachte eine weitere Reduktion der intraperitonealen Tumormasse auf durchschnittlich $21,5 \pm 36$ mg (Abb. 3).

Die Inzidenz von Trokarmetastasen war nach der Applikation von Heparin (12/15) und in der Kontrollgruppe (12/15) signifikant höher als bei Taurolidin (7/15) oder bei Taurolidin und Heparin (6/15) ($p<0,05$). Unabhängig von der Instillation der unterschiedlichen Substanzen entwickelten sich die Trokarmetastasen in allen Gruppen am

häufigsten an den mit dem Elektroauter durchgeführten Inzisionen ($p<0,01$). Obwohl die Inzidenz an den Kameratrokaren gegenüber der mit dem Skalpell durchgeführten Trokarinzisionen erhöht war, konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p=0,08$) (Tabelle 1).

Diskussion

Berichte über eine vermehrte intraoperative Verschleppung von Tumorzellen und die postoperative Entwicklung von Trokarmetastasen haben zu heftigen Diskussion über den Einsatz laparoskopischer Verfahren in der Tumorchirurgie geführt.

Eine standardisierte und klinisch etablierte Methode zur Verhinderung dieser Bauchwandmetastasen existiert z.Z. nicht, und die minimale Manipulation des tumortragenden Organs und der Einsatz von Bergebeuteln haben bislang ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg gebracht. Die großzügige Exzision der Trokarinzisionen bei der Entdeckung eines Inzidentaloms nach laparoskopischer Cholezystektomie, wie sie Wade et al. [24] vorschlagen, kann allenfalls als sekundäre Maßnahme und nicht als eine primär kausale Therapie zur Verhinderung von Trokarmetastasen angesehen werden.

Eine mögliche Ursache für die Implantation von Tumorzellen könnte in der Verletzung der oberflächigen Mukopolysaccharidschicht des Peritoneums mit hierdurch bedingter Exposition von extrazellulärer Matrix liegen [7, 23]. In den Trokarkanälen kommt es durch intraoperative Manipulation bei liegender Trokarhülse zusätzlich zu einer druckbedingten Minderdurchblutung des Gewebes mit der Gefahr einer Nekrosebildung. Die höhere Inzidenz von Trokarmetastasen am Kameratrokar in unserem Modell im Gegensatz zu der mit dem Skalpell durchgeführten Inzision könnte theoretisch durch eine erhöhte Manipulation

bedingt sein. Durch die Verwendung des Elektrokauters werden sehr wahrscheinlich zusätzlich ausgedehnte Nekrosen verursacht. Die erhöhte Inzidenz von Trokarmetastasen an dieser Trokarinzision in allen Gruppen unterstützt diese Hypothese.

In verschiedenen Tierexperimenten konnte durch die spezifische Bindung von extrazellulärer Matrix die Implantation von Tumorzellen reduziert werden [7, 15, 17, 25]. Heparin scheint über einen ähnlichen Wirkungsmechanismus auf die Adhärenz verschiedener Bakterien, Zellen und anderer Substanzen zu wirken. In verschiedenen Studien führte die intravesikale Instillation von Heparin zu einer Reduktion der Adhärenz verschiedener Substanzen an verletzter Blasenschleimhaut [14, 16, 23]. Hierbei bindet Heparin freies Fibronectin, welches bei einer Traumatisierung der Schleimhaut freigesetzt wird, wodurch eine Wiederherstellung der antiadhärenten Funktion der Blasenschleimhaut erzielt werden kann [23].

Unsere Ergebnisse unterstützen diesen hypothetischen Mechanismus. Obwohl Heparin keinen supprimierenden Einfluß auf die Proliferation der Tumorzellen *in vitro* hatte, konnte durch die intraperitoneale Instillation *in vivo* eine signifikante Verminderung der Tumorzellimplantation erreicht werden. Diese Wirkung kann nicht durch direkte toxische Effekte des Heparins erklärt werden, da Heparin *in vitro* die Viabilität und das Wachstum nicht negativ beeinflusste. Im Gegensatz zur intraperitonealen Tumorumplantation und -entwicklung blieb die Tumorumplantation an den Trokarinzisionen durch die intraperitoneale Instillation von Heparin unbeeinflusst.

Neben den genannten möglichen Wirkungsmechanismen von Heparin werden die Implantation und das Wachstum von Tumorzellen selbstverständlich auch durch verschiedene andere Faktoren beeinflusst. So konnte bei verschiedenen Zellen eine Stimulation des Wachstums durch das wachstumsfördernde $Il-1\beta$, welches beim Menschen hauptsächlich durch mononukleäre Zellen produziert wird, eindeutig belegt werden [21, 27]. Eine perioperativ gesteigerte Produktion von $Il-1\beta$ durch die Peritonealmakrophagen könnte somit theoretisch *in vivo* eine Stimulation des Wachstums der Tumorzellen erklären. Kaidi et al. berichteten über eine Reduktion von peritonealen Verwachsungen nach präoperativer Therapie mit spezifischen Antikörpern gegen $Il-1\beta$ in einem Rattenmodell und erklärten diese Wirkung durch eine Reduktion der Proliferation von Fibroblasten, welche bei der Entstehung von Verwachsungen hauptsächlich beteiligt sind [20].

Eine Substanz, welche nicht nur die $Il-1\beta$ -Produktion von menschlichen peripheren mononukleären Zellen (PBMC) hemmt [4], sondern zusätzlich auch eine signifikante antiadhärente Wirkung auf verschiedene Mikroorganismen hat [20], ist Taurolidin. Obwohl Taurolidin bislang ausschließlich in der Therapie von Infektionen unterschiedlicher Genese Verwendung findet [6, 26], wurde in unserer Studie Taurolidin intraperitoneal appliziert, um die Entstehung von extra- und intraperitonealen Metastasen zu verhindern.

Durch die Instillation von Taurolidin konnte eine erstaunliche und hochsignifikante Verminderung der intra-

und extraperitonealen Metastasen erreicht werden. Hierbei ist eine direkte Hemmung der $Il-1\beta$ -Produktion der Peritonealmakrophagen wahrscheinlich, wodurch den Tumorzellen ein wachstumsfördernder Stimulus entzogen wird. *In vitro* konnte diese Hemmung der $Il-1\beta$ -Synthese der Peritonealmakrophagen durch Taurolidin bestätigt werden. Zusätzlich scheint Taurolidin aber auch eine direkte Wirkung auf die Tumorzellen mit resultierender Hemmung des Zellwachstums zu haben. So konnte *in vitro* die Zellteilung durch die Inkubation mit Taurolidin vollständig gehemmt werden, ohne hierbei einen Zelltod zu verursachen. Der Wirkungsmechanismus dieser direkten Hemmung der Zellteilung ist noch unklar. Bei Bakterien wurde nachgewiesen, daß Taurolidin durch eine Übertragung von Hydroxymethylgruppen an der Zellwand zu einer Hemmung der Teilung des Bakteriums führt [26]. Ob ein ähnlicher Mechanismus für die Supprimierung des Tumorzellwachstums *in vitro* oder *in vivo* verantwortlich ist, bleibt offen und ist Bestandteil laufender Untersuchungen.

Obwohl der Pathomechanismus von Taurolidin und Heparin zum größten Teil zunächst hypothetisch bleibt, konnten durch die intraperitoneale Instillation beider Substanzen die Inzidenz und das Wachstum von extra- und intraperitonealen Metastasen signifikant vermindert werden, ohne hierdurch sichtliche Nebenwirkungen zu verursachen. Da beide Substanzen bereits im klinischen Alltag Einzug gehalten haben, halten wir die hier vorgestellte präventive Therapie zur Verhinderung von Metastasen in der laparoskopischen Chirurgie von malignen Tumoren für eine Anwendung im klinischen Bereich für sinnvoll. Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse führen wir eine standardisierte postoperative Lavage mit 500 ml 0,5%igem Taurolidin/2500 I.U. Heparin bei laparoskopischen Resektionen aller Malignome durch. Trotzdem muß anhand von prospektiv randomisierten Studien die klinische Relevanz dieser tierexperimentellen Ergebnisse am Menschen überprüft werden.

Literatur

1. Allendorf JD, Bessler M, Kayton ML, Oesterling SD, Treat MR, Nowygrod R, Whelan RL (1995) Increased tumor establishment and growth after laparotomy vs laparoscopy in a murine model. *Arch Surg* 130:649-653
2. Baer HU, Metzgar A, Slatelli A, Klaiber C, Ruchti C, Czerniak A (1995) Subcutaneous peri-umbilical metastasis of a gallbladder carcinoma after laparoscopic cholecystectomy. *Surg Laparosc Endosc* 5:59-63
3. Barsoum GH, Windsor CWO (1992) Parietal seeding of carcinoma of the gallbladder after laparoscopic cholecystectomy (letter). *Br J Surg* 79:846
4. Bedrosian I, Sofia RD, Wolff SM, Dinarello CA (1991) Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 3:568-575
5. Berends FJ, Kazemier G, Bonjer HJ, Lange JF (1994) Subcutaneous metastases after laparoscopic colectomy. *Lancet* 344:58
6. Blenkham JJ (1988) Sustained anti-adherence activity of taurolidine (Taurolin) and noxythiolin (Noxyflex S). *J Pharm Pharmacol* 44:509-511

7. Castronovo V, Tarabolletti G, Sobel ME (1991) Laminin receptor complementary DNA-deduced synthetic peptide inhibits cancer cell attachment to endothelium. *Cancer Res* 51:5672-5678
8. Cava R, Roman J, Gonzalez Quintela A, Martin F, Aramburo P (1990) Subcutaneous metastasis following laparoscopy in gastric adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol* 16:63-67
9. Clair D, Lautz D, Brooks D (1993) Rapid development of umbilical metastasis after laparoscopic cholecystectomy for unsuspected gallbladder carcinoma. *Surgery* 113:355-358
10. Dubronte F, Wittmann T, Karacsony G (1978) Rapid development of malignant metastasis in the abdominal wall after laparoscopy. *Endoscopy* 10:127-130
11. Faust H, Reichel K (1995) Laparoscopic colon resection is an oncological resection by laparoscopy approach possible? *Zentralbl Chir* 120:392-395
12. Franklin ME, Rosenthal D, Norem RF (1995) Prospective evaluation of laparoscopic colon resection versus open colon resection for adenocarcinoma. *Surg Endosc* 9:811-816
13. Fusco MA, Paluzzi MW (1993) Abdominal wall recurrence after laparoscopic-assisted colectomy for adenocarcinoma of the colon. *Dis Colon Rectum* 36(9):858-861
14. Gill WB, Jones KW, Ruggiero KJ (1982) Protective effects of heparin and other sulfated glycosaminoglycans on crystal adhesion to injured urothelium. *J Urol* 127:151-154
15. Goldstein DS, Lu ML, Hattori T, Ratliff TL, Loughlin KR, Kavoussi LR (1993) Inhibition of peritoneal tumor-cell implantation: model for laparoscopic cancer surgery. *J Endourol* 7:237-241
16. Hayman EG, Pierschbacher D, Ruoslahti E (1985) Detachment of cells from culture substrate by soluble fibronectin peptides. *J Cell Biol* 100:1948-1954
17. Humphries MJ, Olden K, Yamada KM (1986) A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233:467-470
18. Jacobi CA, Keller H, Mönig S (1995) Implantation metastasis of unsuspected gallbladder carcinoma after laparoscopy. *Surg Endosc* 9:351-352
19. Johnstone AS, Rohde DC, Swartz SE, Fetter JE et al. (1996) Port site recurrence after laparoscopic and thoracoscopic procedures in malignancy. *J Clin Oncol* 14:1950-1956
20. Kaidi AA, Nazzari M, Gurchumelidze T (1995) Preoperative administration of antibodies against tumor necrosis factor- α and interleukin-1 and their impact on peritoneal adhesion formation. *Am Surg* 61:569-572
21. Lanfranccone L, Boraschi D, Ghiara P (1992) Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-monocyte CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 and IL-2) and are activated and stimulated to grow by IL-1. *Blood* 80:2835-2842
22. Mosmann T (1983) *J Immunol Methods* 65:55-63
23. See WA, Chapman PH (1987) Heparin prevention of tumor cell adherence and implantation on injured urothelial surfaces. *J Urol* 138:182-187
24. Wade TP, Comitolo JB, Andrus CH, Goddwin MN, Kaminski DL (1994) Laparoscopic cancer surgery. *Surg Endosc* 8:698-701
25. Whalen GF, Ingber DE (1989) Inhibition of tumor cell attachment to extracellular matrix is a method for preventing tumor recurrence in a surgical wound. *Ann Surg* 210:758-764
26. Wicki O, Pfirrmann RW (1979) Taurolin bei Peritonitis. In: *1. Lokalisation chirurgischer Infektionen*. Huber, Bern
27. Yanagisawa M, Imai H, Fukushima Y (1994) Effects of tumour necrosis factor α and interleukin 1 β on the proliferation of cultured glomerular epithelial cells. *Virchows Arch* 426:581-586